Standar Nasional Indonesia

SNI 01-2328-1991

Penentuan bacillus cereus

ICS 67.120.30

Badan Standardisasi Nasional

Daftar isi

Penentuan bacillus cereus

A Pendahuluan:

Bacillus cereus adalah bakteri aerob, membentuk spora dan yang umum dijumpai dalam tanah, sayur-sayuran dan pada banyak bahan makanan mentah dan diproses. Mikroorganisma ini berkembang hiak dalam bahan makanan yang lembab, telah dimasak dan dalam bahan makanan sumber protein yang disimpan pada suhu refrigerasi yang tidak cukup. B. cereus dalam jumlah yang banyak (10' atau lehih per gram) dapat mengakibatkan keracunan makanan tingkat sedang dengan tanda-tanda dan lama yang hampir sama dengan keracunan akibat C. perfringens. Beberapa makanan yang telah menjadi media penyebab keracunan karena B. cereus adalah pudding vanila, makanan yang terdiri dari daging dan sayuran serta nasi kukus atau nasi goreng.

B Peralatan:

1. Seperti pada Penyiapan Homogenasi Contoh.
2. Petridish.
3. Pipet.
4. Inkuhator 30 ± 1°C.

C Media dan reagensia:

1. Phenol red-egg yolk - polymyxin (MYP) agar.
2. KG agar.
3. Phenol red - carbohidrate broth base.
4. Nitrate broth.
5. Starch agar.
6. Litmus milk.
7. Buffered glucosa broth (MR - VP media).
8. Nutrient gelatin.
9. Nutrient agar.
10. Material untuk pewarnaan gram.
11. Larutan Lugol's iodine.
12. Larutan sulfanilic acid.
13. Cleve's acid, atau larutan alpha napthol acetic acid.
14. Creatine crystal.
15. Larutan potassium hydroxide 40%.
16. Larutan alpha napthol alcoholic.
17. Larutan pewarnaan methyele blue.

D Penyiapan contoh:

1. Siapkan contoh sesuai dengan prosedur pada Penyiapan Homogenasi Contoh.
2. Siapkan sampai pengenceran $10^{-'}$.
3. Oleskan 0,1 ml setiap pengenceran pada phenol red-egg yolk polymyxin agar atau KG agar pada petridish.
4. Inkubasi MYP agar secara aerobik pada suhu 30°C selama 48 jam.
5. Inkubasi KG agar pada suhu 30°C selama 20‾24 jam.

E Isolasi B. cereus :

Hitung koloni-koloni yang dikelilingi oleh lingkaran yang penuh dengan uap air (aktifitas lecithinase) dengan latar belakang berwarna ungu-merah yang jelas pada MYP agar dan dihitung jumlahnya per gram sedian. Koloni ini adalah presumptive B. cereus. Hitung koloni pada KG agar yang juga dikelilingi oleh zone dengan aktifitas lecithinase.

F Identifikasi B. cereus : (lihat tabel dibawah).

1. Ambil secara acak agar yang mengandung koloni tersangka (sesuai dengan jumlah akar dari jumlah sel yang terdapat dalam agar), pindahkan pada nutrient agar miring, dan inkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam.
2. Sediakan gram stain atau pewarnaan dengan methylene blue dari nutrient agar miring untuk pengujian morfologi di mikroskop. B. cereus akan berbentuk batang kecil, gram positif dengan ujung-ujung yang berbentuk persegi, dalam rangkaian yang pendek sampai panjang; spora berbentuk elips berdinding tipis dan tidak menggembung karena adanya sporangium.
3. Apabila KG agar digunakan sebagai media isolasi, pemeriksaan awal untuk karakteristik sporolasi dapat dilakukan langsung pada koloni tersangka dengan menggunakan pewarnaan gram atau pewarnaan methylene blue yang kemudian dilanjutkan dengan pengamatan mikroskop.
4. Inokulasi media-media dibawah ini dengan koloni yang berasal dari nutrient agar miring yang telah diinkubasi selama 24 jam.

   a. Phenol red carbohydrate broth :
   - Inokulasi tabung-tabung glukosa, sukrosa, gliserol dan salicin.
   - Inkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam.
   - Catat terbentuknya gas dan asam. B. cereus memfermentasi semua karbohidrat dengan memproduksi asam (media berubah menjadi kuning), tetapi tidak ada gas.

   b. Nitrate broth :
   - Inokulasi clan inkubasi pada suhu 30°C selama 18 - 24 jam.
   - Tambahkan 0,5 - 1 ml sulfanilic acid solution pada masing-masing tabung dan tambahkan pula Cleve's acid atau alpha napthol acetic acid (salah satu saja)

kedalam masing-masing tabung.

- Kocok tabung-tabung tersebut dan amati warnanya. Terbentuknya warna merah atau merah muda (oranye dengan alpha napthol) menunjukkan adanya tes reduksi nitrat yang positif. B. cereus mereduksi nitrat.

c. Litmus milk :

Inokulasi dan inkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. B. cereus menyehabkan terjadinya peptonisasi yang cepat tanpa atau dengan terjadinya pengendapan yang tipis.

d. Nutrient gelatin :

- Tusuk dengan jarum dan inkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam dengan posisi berdiri.
- B. cereus merubah gelatin menjadi cairan dengan cepat.

e. Starch agar :

- Tuangkan starch agar pada petridish, keringkan permukaannya, dan buat "streak " dari koloni dengan menggunakan jarum inokulasi berdiameter. 2 atau 3 sel dapat diujikan pada media yang sama.
- Inkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam.
- Tuangi permukaannya dengan Lugol's iodine hingga menggenang. Zone kering pada sekitar "streak" menunjukkan adanya hidrolisa starch. B. cereus menghidrolisa starch.

f. Buffered glucosa broth (VP medium) :

- Inokulasi dan inkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam.
- Tes terbentuknya acetylmethylcarbinol dengan memipet 1 ml kultur dan memasukkannya kedalam tabung reaksi, dan menambahkan 0,6 ml alpha napthol dan 0,2 ml potassium hydroxide 40%.
- Kocok dan tambahkan sedikit kristal creatine.
- Baca hasilnya setelah disimpan selama 4 jam dalam suhu ruang. Terbentuknya warna merah muda menunjukkan adanya tes positif. B. cereus memberikan hasil yang positif.

g. Pelaporan hasil :

- Catat hasil pemeriksaan mikroskop dari semua koloni tersangka.
- Catat data tes biokimia.
- Hitung jumlah presumtive B. cereus (jumlah koloni yang membentuk zone dikalikan pengenceran).
- Hitung jumlah confirm B. cereus dengan mengalikan jumlah koloni presumptive dengan faktor yang ditentukan pada tes konfirmasi.

Tabel 1. Karakteristik Bacillus cereus :

Jenis pengujian	B. cereus.
Reaksi gram	+[a]
Katalase	+
Motilitas	±[b]
Reduksi nitrat	+
Hidrolisa strach (amilum)	±
Hidrolisa gelatin	+
Hidrolisa kuning telur (egg yolk)	+
Pemecahan glukosa anaerobik	+
Reaksi VP	+
Produksi asam pada manitol	-
Hemolisa (rabbit RBC)	+
Patogenik	memproduksi enterotoksin

a : 90 - 100% koloni adalah negatif.

b : 50 - 90% koloni adalah positif.

Tabel 2: **Perbedaan karakteristik Grup I Bacilli yang bersel besar.**

Bentuk pengujian	B. megaterium	B. cereus	B. thuringiensis	B. mycoides	B. anthracis
Gram Reaction	+	+[a]	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Motility	±	±[b]	±	—[c]	—
Reduction of Nitrate	+[d]	+	+	+	+
Hydrolysis of Starch	+	±	+	+	+
Hydrolysis of Gelatin	+	+	+	+	+
Egg Yolk Reaction	—	+	+	+	+
Anaerobic Utilization of Glucose	—	+	+	+	+
VP Reaction	—	+	+	+	+
Acid Produced from Mannitol	+	—	—	—	—
Hemolysis (Rabbit RBC)	—	+	+	+	±
Karakteristik patogenik yang diketahui		memproduksi enterotoksin	Toksin Parasporal patogenik untuk serangga	Pertumbuhan seperti Rhizosid	Patogen untuk binatang dan manusia.

a+ : 90 — 100% strain adalah positif

b± : 50 — 90% strain adalah positif.

c— : 10% strain adalah positif

d+ : 10—50% strain adalah positif.

e lihat keterbatasan tes konfirmasi *B. cereus*.

Lampiran 1: Media pembiakan

Beberapa dari formulasi media tercantum dalam lampiran ini tersedia secara komersial baik dalam bentuk dehindrasi atau yang langsung dapat digunakan. Kecuali adanya ket.entuan-ketentuan yang diperlukan, formulasi komersil tersebut telah dibuktikan baik untuk digunakan pada metoda pengujian yang tercantum diatas. Akan tetapi instruksi untuk penyiapan media harus benar-benar ditaati.

Beberapa formulasi komersial herbeda dengan formulasi aslinya, sebab (1) adanya heherapa modifikasi yang telah dikembangkan atau (2) pembuat media telah menemukan bahwa heherapa perbedaan konsentrasi dan jenis bahan, kontrol pH yang lehih baik, produktifitas, hambatan dan sebagainya dapat dipertahankan. Perubahan-perubahan ini hiasanya mendorong kegunaan dari media untuk tujuan-tujuan tertentu. Perubahan-perubahan formula telah dibuktikan tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroorganisma jika dibandingkan dengan formula aslinya. Selain itu, pengawasan terhadap kualitas dari media komersial memerlukan pengujian-pengujian untuk produktifitas, hambatan dan sebagainya untuk setiap lot media dengan pengujian kontrol mikroorganisma terpilih secara hati-hati. Oleh sebab itu kualitas dari media dehidrasi pada umumnya mempunyai tingkat yang lebih baik dibandingkan dengan media yang dibuat di laboratorium.

Merupakan suatu hal yang harus dilakukan untuk menginokulasi 1 set mikroorganisma kontrol pada setiap lot media. Pelaksanaan ini sangat disarankan terutama pada laboratorium yang berhubungan dengan riset dan pengembangan metoda analisa yang tergantung pada karakteristik hiokimia spesifik dari mikroorganisma.

Glucosa Broth (MR - VP Broth) - Buffered

Proteose peptone	7 g
Glucose	5 g
Dipotassium phosphate ($K_2\ NPO_4$)	5 g
Aquadest	1 liter

Apabila digunakan untuk kultur V. parahaemolyticus gunakan 30 gr NaCl per liter. Larutkan peptone, glukosa dan potassium phosphate dalam 800 ml air dengan pemanasan yang sedang; saying, dinginkan hingga 20°C, encerkan hingga 1 lt. Pindahkan tiap 10 ml dalam tahung reaksi, dan autoclave selama 12-15 menit pada suhu 121°C. Maksimum pemanasan harus 30 menit. pll akhir 6,9 ± 0,2.

KG Agar Medium

Digunakan untuk media isolasi dan sporulasi B. cereus Basal medium.

Peptone	1.0 g

Yeast extract	0.5 g
Phenol red	0.025 g
Agar	18.0g
Aquadest	900 ml

Sesuaikan pH sampai 6,8. Autoclave basal medium pada suhu 121°C selama 20 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan sampai 50°C. tambahkan 100 ml concentrated egg yolk emulsion steril (oxoid) dan polymixin B sulfate secukupnya untuk memperoleh konsentrasi 10 ug/ml pada 900 ml basal medium. Aduk hingga homogen (dengan sedapat mungkin menghindari terbentuknya busa), tuang dalam petridish, hiarkan membeku, dan simpan sedemikian rupa untuk menghindari kelebihan uap air diatas permukaannya.
Media akhir dapat disimpan selama 1 minggu pada suhu 4°C sebelum digunakan. Tidak disarankan untuk menyimpan lebih lama.

Litmus Milk

Skim-milk powder	100 g
Litmus	5 g
Aquadest	1 liter

Letakkan semua bahan dalam tabung berukuran 2 liter dan secara bertahap tambahkan 1 liter aquadest, aduk terus menerus. Sesuaikan pH sampai 6,8 ± 0,1. Pindahkan tiap 10 ml kedalam 15 x 150 mm tabung reaksi dan autoclave 121°C selama 15 menit.

Nutrient Gelatin

Beef extract	3 g
Peptone	5 g
Gelatin	120 g
Aquadest	1 liter

Larutkan bahan, dan autoclave 1214C, 12 menit. pH akhir 6,8 ± 0,2.
Medium dehidrasi komersial cukup memuaskan untuk digunakan, kecuali ada ketentuan tertentu.
Apabila digunakan untuk V. parahaemolyticus, medium diatas harus ditambahkan 30 gr NaCl/ liter dan pH harus 7.0.

Phenol Red-Egg Yolk-Polymyxin Agar

Meat extract	1 g
Peptone	10 g
D-Mannitol	10 g
Sodium chloride	10 g
Phenol red	0,025 g
Agar	15 g

Aquadest	1 liter

Masukkan semua bahan kedalam air, dan didihkan hingga merata. Pindahkan tiap-tiap 90 ml kedalam botol,dan sterilisasi 121°C selama 15 menit. pH akhir 7,2 ± 0,2. Dinginkan hingga 45°C, dan tambahkan 10 ml emulsi egg yolk dan 1 ml larutan aquadest B sulfate 0,1% yang telah difilter sterilisasi.

Egg yolk emulsion. Lapisi dan sterilisas kulit telur dengan mencelupkan telur-telur segar kedalam larutan mercuric chloride 0,1%. Secara aseptis, pisahkan kuning telur dari telur dan letakkan pada silinder berukuran yang steril. Tambahkan NaCl 0,85% steril dengan volume yang sama, dan aduk hingga homogen.

Phenol Red Carbohydrate Broth

Trypticase atau proteose peptone 3	10 g
Sodium chloride	5 g
Beef extract (jika diperlukan)	1 g
Phenol red (atau 7.2 ml of 0.25% larutan phenol red)	0.018 g
Aquadest	1 liter

Larutkan 5 gr dulcitol, 10 gr lactose atau 10 gr sucrose (seperti pada pengujian salmonella) dalam basal broth ini. Pindahkan tiap 2,5 ml kedalam tabung reaksi 13 x 100 mm yang berisi 6 x 50 mm tabung fermentasi terbalik. Autoclave 118°C, 10 menit pH akhir 7,3 ± 0,2.

Cara lain, larutkan bahan, pisahkan karbohidrat, dalam 800 ml air dan panaskan dengan pengadukan; pindahkan tiap-tiap 2 ml kedalam tabung reaksi 13 x 100 mm yang berisi tabung fermentasi terbalik. Autoclave 118°C, 15 menit, dan biarkan hingga dingin. Larutkan karbohidrat dalam 200 ml air, dan sterilisasi dengan menyaring larutan dengan filter penahan bakteri. Secara aseptic tambahkan 0,5 ml filtrat steril kedalam tiap tabung broth steril setelah pendinginan sampai 45°C. Kocok perlahan-lahan. pH akhir 7.4 ± 0.2.

Starch Agar

Beef extract	3 g
Peptone	5 g
Soluble starch	2 g
Agar	15 g

Tambahkan semua bahan kecuali strach kedalam 1 liter aquadest dan didihkan. Kernudian tambahkan strach perlahan-lahan dengan pengadukan. Didihkan 3 - 4 menit sampai larutan merata. Dinginkan sampai 50 - 60°C, dan sesuaikan pH setelah autoclave, 7,2 ± 0,2. Autoclave 121°C, 10 menit.

Lampiran 2: Reagensia dan diluen

Larutan Lugol

Potassium iodide	10 g
Iodine	5 g
aquadest	100 ml

Larutkan potassium iodide 20-30 ml kedalam aquadest. Tamhahkan Iodine dan panaskan perlahan-lahan dengan pengadukan yang konstan sampai iodine terlarut. Encerkan sampai 100 ml dengan aquadest.

Lugols solution tanpa pengenceran jangan disalah artikan dengan modified Lugol's solution yang digunakan pada gram stain. Larutan ini disarankan untuk digunakan sehagai indikator pada hidrolisa starch oleh B. cereus. Lugol's solution disarankan dalam hentuk pengenceran atau mengalami modifikasi dalam beherapa hat. Lugol's solution dengan kadar pekat harus disimpan dalam hotol galas bertutup berwarna dan ruangan yang gelap.

Reagensia Test Nitrite

A. Reagensia Sulfanilic acid

Sulfanilic acid	1 g
Acetic acid, 5N	125 ml

B. Reagensia alpha-Maphthylamiae

α-Naphthylamine	1 g
Acetic acid, 5N	200 ml

Untuk menyiapkan acetic acid 5N, tambahkan 28,75 ml glacial acetic acid kedalam 71,25 aquadest.

Pengujian dilakukan dengan menambahkan reagensia A dan B langsung ke kultur yang tum-huh pada medium cairan atau semi-solid. Beberapa pekerja menyukai mencampur reagensia A dan B dengan volume yang sama, kemudian menambahkan 0,1 ml larutan campuran tersebut. ke kultur. Beberapa menyarankan menambahkan 2 tetes reagensia A yang kemudian diikuti segera dengan menambahkan reagensia B. Terjadinya warna merah menunjukkan hasil yang positif, sedang kontrol harus negatif. Tes negatif harus dinlang dengan menambahkan serbuk seng. Jika warna merah terbentuk, nitrat, tidak direduksi.

Perhatian : Baru-baru ini telah dibuktikan hahwa α-naphthylamine sehagai zat karsinogenik. Oleh sehab itu, meskipun penggunaan kurang dari 1%: yang masih diperholehkan, tetapi zat ini sukar untuk didapat. Telah ditemukan hahwa N,N dimethyl-1 -naphthylamine (DM-ANA)

atau Cleve's (5-amino-2-naphthylene sulfonic acid) dapat digunakan sebagai pengganti a-naphthylamine. Kesulitan yang dijumpai bahwa pembentukan warna terjadi lebih lambat dengan DM-ANA dan warna mudah hilang dengan Cleve's acid.

Nutrient Agar

Beef extract	3 g
Peptone	5 g
Agar	15 g
Aquadest	1 liter

Panaskan hingga mendidih untuk melarutkan semua bahan. Bagikan kedalam tabung-tabung reaksi atau wadah lain, dan aotuclave selama 15 menit pada suhu 121°C. pH akhir 6,8 ± 0,2. Apahila digunakan sebagai bahan dasar untuk blood agar, tambahkan 8 - 9 NaCl untuk mencegah ierjadinya hemolisa dari sel-sel darah merah.

Reagensia Tes Voges - Proskauer (VP)

Larutan 1.

α-Naphthol	5 g
Alcohol (absolut)	100 ml

Larutan 2.

Potassium hydroxide	40 gr.

Lakukan VP test pada suhu ruang dengan memindahkan 1 ml kultur yang berumur 48 jam ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 0,6 ml a-naphthol (larutan 1) dan 0,2 ml KOH 40% (larutan 2); kocok setelah penambahan tiap-tiap solution. Untuk memperoleh reaksi yang cepat dan intensif, tambahkan beberapa kristal creatine dalam tes medium. Baca hasilnya setelah 4 jam penambahan reagensia-reagensia. Tes VP positif bila terbentuk warna merah muda eosin.

Lampiran 3: Pewarnaan dan prosedur pewarnaan

Pewarnaan Methylene Blue (Loeffler's)

Larutan A

Methylene blue (90% dye content)	0,3 g
Ethyl alcohol (95%)	30 ml

Larutan B

Potassium hydroxide yang diencerkan (0,01 %)	100 ml

Campur larutan A dan B.

Pewarnaan Gram

Hucker's Crystal Violet, Larutan A

Crystal violet (mengandung 90% , warna)	2 g
Ethyl alcohol (95%)	20 ml

Larutan B

Ammonium oxalate'	0,8 g
Arntadest	80ml

Campur larutan A dan B. Simpan selama 24 jam dan saring melalui kertas penyaring kasar.

Gram's Iodine

Iodine	1 g
Potassium iodide	2 g
Aquadest	300 ml

Letakkan Kl dalam mortar, tamhahkan iodine, dan giling dengan alai, penggiling selama 5-10 tambahkan 1 ml air dan giling, kemudian 5 ml air dan giling, lalu 10 ml dan giling. Pada saat KI plan iodine menjadi suatu larutan. Tuang dalam hotol reagensia. Bilas mortar dan penggiling dengan air yang cukup hingga diperoleh volume 300 ml.

Hucker's Counterstain (Larutan stok)

Safranin O (disertifikasi)	2,5 g
Ethyl alkohol (95%)	100ml

Penggunaannya, tambahkan 10 ml larutan stok kedalam 90 ml aquadest.

Prosedur pewarnaan.

Fiksasi film yang kering karena di angin-anginkan dengan melewatkan film melalui api burner dengan cepat sebanvak 3-4 kali.

Warnai film selama 1 menit dengan larutan crystal violet ammonium oxalate, dan cuci sehentar :ie nYan air mengalir (jangan lehih dari 5 detik).
Bubuhkan Gram Todine selama 1 menit. Cuci dengan air kran.

Dekdorisasi dengan 95% ethyl alcohol sampai 15 dak ada lagi warna biru (sekitar 30 detik). ebagai prosedur alternatif, rendam slide dengan alcohol, segera angkat, dan rendam lagi dengan alcohol selama 10 detik.
Cuci, dan hilangkan kelebihan air, dan buhuhkan safrarin counterstain selama 1 menit.

Beberapa dari organisma-organisma gram-negatif tidak dapat segera melepaskan warna setelah diadakan pewarnaan dengan Hucker's crystal violet. Bila bekerja dengan gonococcus, encerkan larutan crystal violet 1 : 5 dengan aquadest dan campur 1 bagian larutan crystal violet yang telah diencerkan tersebut, 4 bagian larutan amonium oxalate. Bila bekerja dengan bakteria anaeroh, campur 1 bagian Hucker's crystal violet dengan 1 bagian sodium bicarbonate1% segera sebelum pewarnaan.